

На правах рукописи

**Илатовский Андрей Владимирович**

**МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ  
НАДНУКЛЕОСОМНОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА  
И РАСЧЁТА СПЕКТРОВ  
МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ**

03.01.02 — биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург — 2012

Работа выполнена в лаборатории биофизики макромолекул Отделения молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» (г. Гатчина).

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук  
Исаев-Иванов Владимир Васильевич.

Официальные оппоненты: Сергей Борисович Вахрушев,  
доктор физико-математических наук,  
профессор, ФГБУН Физико-технический  
институт им. А. Ф. Иоффе РАН,  
заведующий лабораторией;

Тулуб Александр Александрович,  
доктор физико-математических наук,  
Санкт-Петербургский  
государственный университет,  
ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Объединённый институт  
ядерных исследований,  
Дубна.

Защита состоится 23 мая 2012 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет» по адресу:

195251, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 5,  
факультет медицинской физики и биоинженерии, ауд. 305.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет».

Автореферат диссертации разослан \_\_\_\_ апреля 2012 г.

Учёный секретарь  
диссертационного  
совета

доктор физико-математических наук  
Власова Ольга Леонардовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Ядерная ДНК в геномах эукариот представляет собой нуклеопротеиновый комплекс — хроматин. Для компактного хранения генетической информации и обеспечения доступа к ней требуется его определённая организация. В середине 1970-х гг. было известно, что хроматин состоит из ДНК и гистонов Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. На основании имеющихся данных была выдвинута гипотеза о существовании структурного элемента хроматина, которая позднее была подтверждена экспериментально. Обнаруженные частицы назвали нуклеосомами. В 1997 г. была получена полноатомная структура нуклеосомы.

Достигаемая с помощью нуклеосомной организации степень компактизации хроматина является недостаточной для объяснения наблюдаемой плотности упаковки ДНК в ядре, что указывает на наличие наднуклеосомных структур хроматина. Наблюдаемые при помощи электронной микроскопии нити хроматина диаметром 30 нм считаются следующим уровнем компактизации ДНК. За прошедшие десятилетия нити хроматина изучались множеством экспериментальных методов, однако полученные результаты не позволяют сделать однозначных выводов об их структуре, а ряд исследователей ставит под сомнение само существование регулярной упаковки нуклеосом в 30-нанометровые нити.

Определённый прогресс достигнут в исследовании структуры хроматина в масштабе целого ядра. Применение биофизических и биохимических методов позволило установить двухуровневую фрактальную организацию хроматина и, в ряде случаев, построить трёхмерные модели исследуемых геномов. Тем не менее единая молекулярная модель структурной организации хроматина, охватывающая все уровни компактизации ДНК, от нуклеосомного до геномного, пока не создана.

В нашей лаборатории получены данные о малоугловом рассеянии нейтронов (МУРН) на различных клеточных ядрах. Графики экспериментальных спектров МУРН имеют линейные участки в двойном логарифмическом масштабе для широкого интервала значений вектора рассеяния, что указывает на фрактальную организацию хроматина.

МУРН обладает рядом преимуществ перед другими экспериментальными методами исследования структуры хроматина. Во-первых, он позволяет получить данные о структуре хроматина в нативном ядре без применения биохимических техник выделения отдельных нитей хроматина. Во-вторых, при использовании метода вариации контраста

возможно наблюдать рассеяние нейтронов на различных частях нуклеопротеидных комплексов, например, при концентрации тяжёлой воды в растворе порядка 65 % спектр МУРН будет обусловлен преимущественно белковой компонентой. В-третьих, спектры МУРН охватывают практически полный интервал размеров наднуклеосомных структур хроматина, от нуклеосомных до геномных. Указанные преимущества использования МУРН для исследования структуры хроматина и других биомакромолекулярных комплексов обуславливают большое число нейтронных экспериментов для изучения биологических объектов.

Существует несколько методов расчёта спектров малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновского излучения для молекулярных моделей, разработаны соответствующие компьютерные программы. В рамках аналитического подхода может быть использовано полишаровое представление объекта, расчёт спектров МУРН в таком случае осуществляется при помощи формулы Дебая. Другим приближением является представление однородного объекта в виде радиальной оболочки, которая аппроксимируется сферическими функциями, что позволяет вычислить спектр рассеяния. Кроме того, в ряде работ разработаны методы непосредственного вычисления функции распределения парных расстояний (ФРПР) и получения спектров МУРН с помощью Фурье-преобразования. Общим недостатком этих методов является их неприменимость для систем большого размера, таких как сложные биомакромолекулярные комплексы, состоящие из миллионов атомов.

Таким образом, разработка методов молекулярного моделирования наднуклеосомной структуры хроматина геномного размера (порядка  $10^6$  нуклеосом, или  $10^{10}$  атомов) и соответствующих методов расчёта спектров МУРН, применимых для систем такого размера, является актуальной биофизической задачей. Её решение позволит рассчитывать спектры МУРН и другие свойства моделей наднуклеосомной структуры хроматина для исследования влияния различных параметров на экспериментально наблюдаемые характеристики хроматина.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы являлась разработка методов молекулярного моделирования наднуклеосомной структуры хроматина геномного размера и расчёта спектров МУРН для получаемых моделей нуклеопротеидных комплексов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. разработать метод построения физической модели нуклеосомы и со-

ответствующий метод расчёта спектров МУРН, применимый для нуклеопротеидных комплексов геномного размера;

2. определить геометрические параметры межнуклеосомного интерфейса и разработать методы построения геометрических моделей наднуклеосомных структур геномного размера;

3. разработать методы построения фрактальных наднуклеосомных структур с заданным значением фрактальной размерности;

4. рассчитать спектры МУРН для построенных моделей наднуклеосомной структуры хроматина и сопоставить с полученными экспериментально.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный метод расчёта спектров МУРН, основанный на методе Монте-Карло, применим для нуклеопротеидных комплексов, состоящих из  $\sim 10^{10}$  атомов.

2. Разработанный алгоритм фрактальной генерации наднуклеосомных структур позволяет создавать фрактальные структуры с заданной фрактальной размерностью в интервале  $2 \leq d_s < 3$ .

3. Спектры МУРН, рассчитанные для фрактальных моделей наднуклеосомной структуры хроматина высоких порядков упаковки, имеющих две фрактальные размерности, удовлетворительно описывают экспериментально наблюдаемые спектры МУРН, а именно имеют степенной характер зависимости интенсивности рассеяния от величины вектора рассеяния ( $I \propto s^{-d_I}$ ) и точку кроссовера, определяющую переход от одной фрактальной размерности  $d_I$  к другой.

### **Научная новизна**

1. Разработан метод построения фрактальных моделей наднуклеосомной структуры хроматина с заданным значением фрактальной размерности или двумя различными значениями фрактальной размерности.

2. Разработан метод расчёта спектров МУРН, применимый для нуклеопротеидных комплексов геномного размера.

3. Построена фрактальная молекулярная модель наднуклеосомной структуры хроматина геномного размера ( $\sim 10^6$  мононуклеосомных частиц) с двумя фрактальными размерностями, описывающая двухуровневую фрактальную организацию хроматина.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Разработанные методы построения молекулярных моделей наднуклеосомной структуры хроматина могут быть использованы при расчёте

спектров МУРН и других экспериментально наблюдаемых характеристик хроматина, таких как карта контактов удалённых по цепи участков геномной ДНК и диффузионное поведение маркеров для исследования роли различных геометрических и физических параметров.

Разработанные методы расчёта спектров МУРН могут применяться как для моделей наднуклеосомной структуры хроматина, полученных в данной работе, так и для полноатомных моделей любых биомакромолекулярных или полимерных комплексов с большим количеством атомов, где невозможно применение других методов.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на VIII Национальной конференции «Рентгеновское, синхротронное излучения, нейтроны и электроны для исследования наносистем и материалов» (Курчатовский институт, Москва, 2011), на XV Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология — наука XXI века» (Пущино, 2011), на XI Международной конференции по рассеянию рентгеновского излучения и нейтронов на поверхностях SXNS-11 (Северо-Западный университет, Эванстон, Иллинойс, США, 2010), на XX и XXI Сессиях по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния (ПИЯФ, Гатчина, 2008, Курчатовский институт, Москва, 2010), на Санкт-Петербургском семинаре по компьютерной биологии (СПбГПУ, Санкт-Петербург, 2009), на IX конференции молодых учёных Отделения молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ РАН (ПИЯФ, Гатчина, 2008), на XVI и XVII Политехнических симпозиумах «Молодые учёные — промышленности Северо-Западного региона» (СПбГПУ, Санкт-Петербург, 2007, 2008).

Начальный этап работы (магистерская диссертация) был отмечен медалью «За лучшую научную студенческую работу» по итогам Всероссийского открытого конкурса на лучшую научную работу студентов вузов по естественным, техническим и гуманитарным наукам в 2008 г.

### **Публикации и личный вклад автора**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 4 в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук (полный список приведён на странице 18).

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работы. Личный вклад автора в получение результатов, выносимых на защи-

ту, является определяющим. Вклад автора в совместных публикациях с научным руководителем и/или другими сотрудниками лаборатории является основным (анализ литературы, разработка, апробация и применение методов, расчёты и анализ результатов, написание статей), за исключением публикаций [3, 6, 9], в которых автором была выполнена лишь часть исследования.

## **Объём и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 128 страницах машинописного текста и включает введение, три главы (обзор литературы, методы, результаты и обсуждение) и выводы. Материал иллюстрирован 26 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель содержит 120 источников.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, приведены основные результаты, показано научно-практическое значение работы.

### **1. Обзор литературы**

Обобщены современные представления о структурной организации хроматина на различных уровнях компактизации ДНК. На основе анализа экспериментальных данных был сделан вывод о том, что только нуклеосомный уровень организации исследован с удовлетворительной полнотой, в то время как строение 30-нанометровой нити хроматина остаётся открытым вопросом. Рассмотренные данные о структуре хроматина на уровне целого ядра говорят в пользу двухуровневой фрактальной организации хроматина. Описаны основные принципы МУРН, способы и практические методы вычисления спектров МУРН.

### **2. Методы**

#### **2.1 Геометрическая модель нуклеосомы**

Нуклеосомы считаются геометрически неизменными. ДНК описывается винтовой линией, проходящей через центры отрезков, соединяющих атомы фосфора в каждой паре нуклеотидов, и приближённо вычисляются геометрические параметры, например, шаг суперспирали ДНК определяется как минимальное расстояние между точками, принадлежащими к соседним виткам. Начальные значения оптимизируются для устранения влияния локальных нерегулярностей в конформации ДНК.

## 2.2 Анализ GC-состава сайтов образования нуклеосом

Разработанный алгоритм анализа GC-состава сайтов образования нуклеосом (СОН) в последовательности генома человека hg18 состоит в построении глобального (для целых хромосом) распределения GC-состава и последующем сравнении локальных (для небольших участков) распределений GC-состава с глобальным при помощи U-теста Манна — Уитни для определения участков последовательности ДНК с аномальным (существенно отличающимся от среднего) GC-составом.

## 2.3 Геометрическая модель наднуклеосомной структуры

При построении геометрической модели наднуклеосомной структуры хроматина в режиме *одноцепочечной генерации* нуклеосомы соединяются линкерами, координаты текущей нуклеосомы получаются преобразованием координат предыдущей нуклеосомы в соответствии с параметрами межнуклеосомного интерфейса. В режиме *фрактальной генерации* наднуклеосомной структуры хроматина координаты отдельных нуклеосом вычисляются непосредственно при помощи рекурсивного алгоритма построения (п. 2.3.1). Независимо от выбранного режима генерации самопересечения структуры запрещены.

**В режиме одноцепочечной генерации** построение наднуклеосомной структуры начинается с первой нуклеосомы, имеющей фиксированные координаты. В работе были разработаны два режима одноцепочечной генерации: свободная генерация и генерация в объёме. В режиме *свободной генерации* все параметры интерфейса выбираются случайным образом, при этом длина линкера  $L$  распределена в интервале  $[L_{\min}; L_{\max}]$ , все углы — в интервале  $[0; 2\pi]$ . Режим *генерации в объёме* дополнительно накладывает ограничение в виде кубической или сферической стенки, за пределами которой генерация запрещена. Кроме того, в подрежиме *локально-регулярной генерации* возможно получать регулярные участки максимальной протяжённостью  $N_r$  нуклеосом с фиксированными значениями параметров межнуклеосомного интерфейса.

### 2.3.1 Режим фрактальной генерации

Одним из методов построения фракталов является *преобразование самоподобия*. Фрактал 0-го порядка (инициатор) представляет собой отрезок длиной  $\lambda$ , который на первом шаге построения заменяется на генератор — ломаную, состоящую из  $n$  сегментов длиной  $\lambda/f$  (фрактал 1-го порядка). Далее каждый сегмент генератора заменяется на целый генератор. Для идеального фрактала (из бесконечного числа сегментов)



фрактальная размерность  $d$  определяется как размерность подобия

$$d_s = \frac{\ln n}{\ln f}. \quad (1)$$

Если на каждом шаге генератор произвольно изменяется (при постоянных  $n$  и  $f$ ), то получается случайный фрактал, статистические характеристики которого близки к свойствам идеального фрактала.

С помощью данного метода осуществляется построение фрактальной модели наднуклеосомной структуры хроматина. Генерация заканчивается фракталом порядка  $k = K$ : структура состоит из  $N = n^K$  точек, соединённых сегментами длиной  $\ell = \lambda/f^K$ .  $N$  моделей нуклеосом с эффективным размером  $r_{\max}$  помещаются в декартовы координаты  $N$  точек структуры. Фрактальная размерность структуры может быть определена по формуле (1) или получена из ожидаемой зависимости среднего радиуса гирации  $r_g$  от количества точек  $N_g$ :

$$\langle r_g \rangle \propto [N_g]^{1/d_g}. \quad (2)$$

#### 2.4 Полишаровая физическая модель нуклеосомы

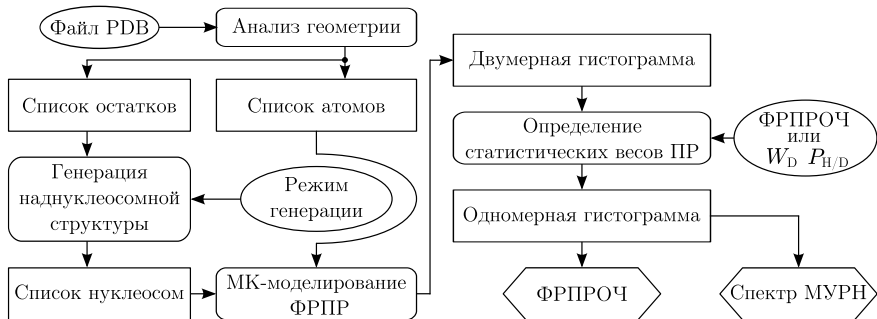
Аналитически спектр МУРН может быть рассчитан для совокупности однородных шаров с помощью формулы Дебая:

$$I(s) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(s) f_j(s) \frac{\sin(sr_{ij})}{sr_{ij}}, \quad r_{ij} = |\vec{r}_j - \vec{r}_i|, \quad (3)$$

где  $\{f_i(s)\}_{i=1}^N$  — амплитуды рассеяния отдельных шаров, зависящие от их плотности длин рассеяния (ПДР) и объёма. Для расчётов с помощью формулы Дебая (3) необходимо построить полишаровую модель нуклеосомы. Для белков и ДНК известны средние значения ПДР. МУРН является низкоразрешающим ( $\sim 10 \text{ \AA}$ ) методом, что позволяет строить упрощённые модели. Исходя из этих данных была выбрана следующая схема построения модели нуклеосомы: гистоновый кор моделируется одним шаром, ДНК — цепочкой шаров, образующих спираль.

#### 2.5 Полноатомная физическая модель нуклеосомы

Автором была разработана оригинальная схема вычислений спектра МУРН с использованием полноатомной структуры (рис. 1). На первом этапе происходит анализ структуры из банка PDB (п. 2.1) и строятся списки атомов и остатков. Последний используется при проверке на самопересечения во время генерации наднуклеосомной структуры (п. 2.3).



**Рис. 1.** Блок-схема расчётов спектров МУРН с использованием полноатомной модели нуклеосомы. Символами  $\circ$ ,  $\square$ ,  $\square$  и  $\diamond$  обозначены входные данные/параметры, вычислительные процессы, промежуточные и выходные данные соответственно

Главным элементом вычислений является расчёт ФРПП, основанный на методе Монте-Карло (МК). ФРПП в пределе учитывает все парные расстояния (ПР) между элементами структуры (ср. с формулой Дебая (3)). Статистическая природа ФРПП позволяет ограничиться некоторым (достаточно большим) числом ПР при сохранении адекватности отражения строения структуры. На каждой МК-итерации случайно выбирается пара атомов, вычисляется ПР между ними, его значение и типы остатков записываются в двумерную гистограмму.

В режиме вычисления ФРПП однородной частицы (ФРПРОЧ) статистический вес каждого ПР равен 0 или 1 в зависимости от выбранных остатков, т. е. возможно вычислить ФРПРОЧ для белковой компоненты или ДНК. В режиме вычисления спектра МУРН статистический вес ПР определяется типом остатков с учётом концентрации тяжёлой воды в растворе  $W_D$  и вероятности обмена атомов водорода на дейтерий  $P_{H/D}$ :

$$w_{ij} = \prod_{i,j} (\rho_k - \rho^S), \rho_i = \frac{L_i^H + W_D P_{H/D} (L_i^D - L_i^H)}{V_i}, \rho^S = \rho_H + W_D (\rho_D - \rho_H),$$

где  $L_i^H$ ,  $L_i^D$ ,  $V_i$  — длина рассеяния в  $H_2O$  и  $D_2O$  и объём остатка  $i$ -го типа,  $\rho_H$  и  $\rho_D$  — ПДР  $H_2O$  и  $D_2O$ . Спектр МУРН получается Фурье-преобразованием одномерной гистограммы.

## 2.6 Модель однородного шара в методе Монте-Карло

Для сравнения двух физических моделей нуклеосомы, полишаровой (п. 2.4) и полноатомной (п. 2.5), а также для выяснения необходимого количества МК-итераций был разработан способ расчёта ФРПР для полишаровой модели. Пусть множество точек  $Q$  равномерно распределено в однородном шаре с радиусом  $R_Q$ . Тогда сферические координаты точки  $Q_i$  определяются выражениями:  $r = R_Q \sqrt[3]{\gamma_1}$ ,  $\cos \theta = 2\gamma_2 - 1$ ,  $\varphi = 2\pi\gamma_3$ , где  $\{\gamma_k\}_{k=1}^3$  — случайные величины, равномерно распределённые в интервале  $[0; 1]$ . При вычислениях ФРПР на каждом шаге по выбору атома происходит генерация точек внутри шаров, и эти координаты используются для вычисления ПР.

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Анализ геометрии нуклеосомных структур из банка PDB

Для оценки структурного разнообразия моонуклеосом операции по определению геометрических параметров (п. 2.1) были проведены для 33 структур из банка PDB. Оказалось, что структуры имеют весьма схожее строение, типичная нуклеосома состоит из 12121 атома, 146 п. н. ДНК образуют 1,8 витка суперспирали диаметром 84,0 Å и шагом 25,8 Å. Нуклеосома 1KX5 была выбрана для дальнейших вычислений как репрезентативный представитель данного класса структур, при этом она имеет максимальные разрешение и количество атомов.

### 3.2 Анализ GC-состава СОН

Для расчёта распределения длин линкеров с помощью специального алгоритма (п. 2.2) был проведён анализ последовательностей СОН. Из последовательности генома были извлечены фрагменты длиной 900 п. н., содержащие 438 599 СОН, и проанализировано относительное содержание участков с аномальным GC-составом. Оказалось, что в последовательностях СОН имеется чёткий сигнал — изменение профиля GC-состава в сторону больших значений. Однако за границами собственно нуклеосом такие сигналы отсутствуют, что не позволяет использовать данный анализ для расчёта распределения длин линкеров.

### 3.3 Расчёты спектров МУРН с использованием полишаровой модели нуклеосомы

На основе геометрических параметров нуклеосомы 1KX5 (п. 3.1) была построена полишаровая модель (п. 2.4). С использованием формулы Дебая (3) были рассчитаны спектры МУРН и ФРПР для полишаровой модели нуклеосомы и построенного на её основе ряда структур длиной

до 15 нуклеосом. Получаемые в рамках этого подхода данные самосогласованы и достаточны для исследования моделей наднуклеосомных структур небольшого размера. Однако метод обладает рядом недостатков, главный из которых — время счёта, что делает его непригодным для расчётов спектров МУРН для структур геномного размера.

Для решения этой проблемы был разработан оригинальный метод расчёта спектров МУРН, основанный на методе Монте-Карло (п. 2.5). С применением модели однородного шара (п. 2.6) для ряда структур были рассчитаны спектры МУРН и сопоставлены с полученными при использовании формулы Дебая (3). Анализ результатов позволил сформулировать критерии выбора параметров МК-моделирования ФРПР.

### **3.4 Расчёты спектров МУРН с использованием полноатомной модели нуклеосомы**

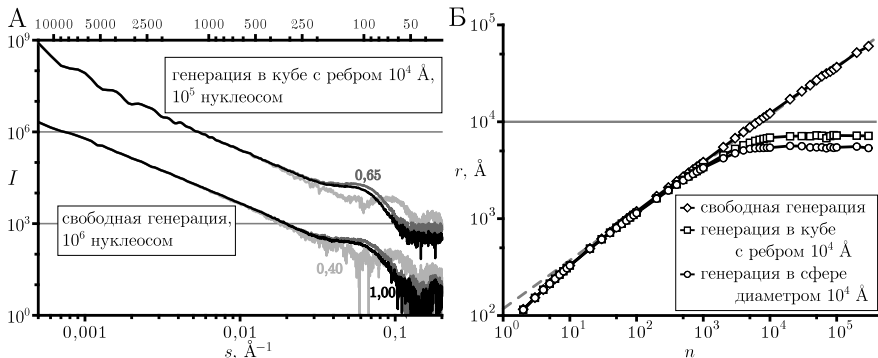
#### **3.4.1 Мононуклеосома**

При построении полноатомной модели нуклеосомы (п. 2.5) были использованы 33 структуры из банка PDB, после чего был проанализирован ряд свойств, важных для МУРН (ПДР, точки компенсации). Как и в случае геометрических параметров (п. 3.1), проанализированные структуры оказались весьма похожи и для дальнейших расчётов была выбрана модель на основе структуры 1KX5.

#### **3.4.2 Наднуклеосомные структуры, полученные в режиме однопочечной генерации**

На основе модели нуклеосомной частицы в соответствии с выбранным режимом генерации (п. 2.3) были построены модели наднуклеосомных структур хроматина. Во всех режимах генерации к случайно растущей цепи нуклеосом применялся ряд ограничений. При свободной генерации длина линкера должна была лежать в определённом диапазоне, также были запрещены самопересечения структуры. Полученные в этом режиме структуры из  $10^6$  нуклеосом имеют характерные линейные размеры порядка  $10^5$  Å и, следовательно, обладают очень низкой плотностью, что послужило причиной введения ограничивающей стенки, т. е. режима генерации в объёме.

Так как эффективный размер используемой модели мононуклеосомы составляет около 100 Å, куб с ребром  $10^4$  Å может содержать до  $\sim 10^6$  нуклеосом. Действительно, в случае применения этой кубической стенки, удельное (в расчёте на одну нуклеосому) время генерации существенно возрастает по мере приближения к предельному значению.



**Рис. 2.** Свойства моделей наднуклеосомных структур, полученных в режиме одноцепочечной генерации. **А.** Спектры МУРН для двух моделей наднуклеосомных структур для указанных на графике значений  $W_D$ . Обе серии спектров приведены в относительных единицах (о. е.) для помещения на один график. Дополнительная шкала показывает размеры в  $\text{Å}$  в прямом пространстве. **Б.** Зависимость среднеквадратичного расстояния между концами цепи от длины цепи для структур из  $10^6$  нуклеосом. Горизонтальная линия указывает размер стенки. Штриховой линией показана линейная аппроксимация (ЛА) с коэффициентом углового наклона (КУН) 0,5

Типичные спектры МУРН для наднуклеосомных структур имеют нуклеосомную ( $s > 0,02 \text{ Å}^{-1}$ ) и наднуклеосомную ( $s < 0,02 \text{ Å}^{-1}$ ) области (рис. 2А). В последней спектры независимы от  $W_D$ , а в нуклеосомной части имеют ряд  $W_D$ -зависимых особенностей, аналогичных тем, что наблюдались для моонуклеосомы. Кроме того, в спектре белковой компоненты (при  $W_D = 0,65$ ) имеется пик  $0,06 \text{ Å}^{-1}$ , обусловленный узким интервалом длин линкеров.

В наднуклеосомной области спектр МУРН является линейным с КУН  $-2,0$  (рис. 2А), т. е. структура проявляет свойства фрактала размерности  $2,0$ , что близко к экспериментально наблюдаемому спектру, полученному в  $40\%$   $D_2O$  (КУН  $-2,2$ ). Однако экспериментальные спектры в  $64\%$  и  $>99\%$   $D_2O$  имеют отличные значения КУН, равные  $-2,5$  и  $-2,4$  соответственно. Это не может быть объяснено в рамках простой наднуклеосомной модели. Относительная интенсивность пика  $0,06 \text{ Å}^{-1}$  выше в расчётных спектрах по сравнению с экспериментальными — должен существовать неучтённый фактор, способный изменить ФРП белковой компоненты структуры, например, нуклеосомный белок.

Наднуклеосомные структуры, полученные в режиме свободной генерации, имеют чрезвычайно низкую плотность, порядка  $10^6$  нуклеосом

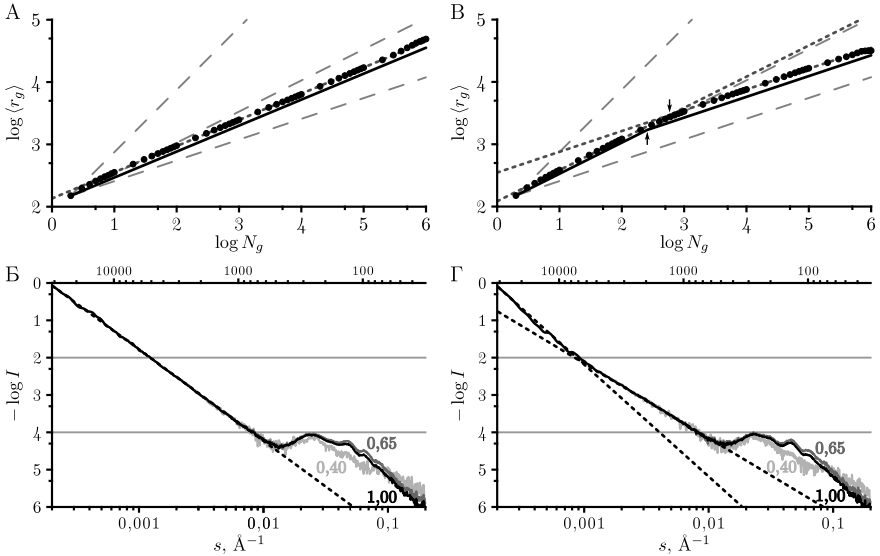
в кубе с ребром  $10^5 \text{ \AA}$ , тогда как  $\sim 2 \times 10^9$  п. н. полного генома курицы ( $\approx 10^7$  нуклеосом) упакованы в ядре диаметром около 3 мкм. Для увеличения плотности структуры был введён режим генерации в объёме. Единственным отличием между рассчитанными спектрами МУРН для двух типов наднуклеосомных структур оказалась серия пиков, обусловленная форм-фактором ограничивающей стенки (рис. 2А). Более детальный анализ показал (рис. 2Б), что внутри ограниченного объёма свойства структур совпадают, отличия наблюдаются только на размерах, близких к размеру стенки. Таким образом, несмотря на существенно бóльшую (на три порядка) среднюю плотность структуры, ограничивающая стенка является недостаточным фактором для изменения фрактальных свойств системы.

Для выяснения влияния регулярной упаковки нуклеосом на спектры МУРН были созданы **локально-регулярные модели** наднуклеосомной структуры из  $10^6$  нуклеосом с использованием регулярных структур, соответствующих моделям «зигзаг» и «соленид», длиной до  $N_r = 20$  нуклеосом. Их спектры в наднуклеосомной области являются линейными с КУН  $-2$ , и только в нуклеосомной области наблюдается ряд особенностей, обусловленных наличием регулярных структур.

### 3.4.3 Наднуклеосомные структуры, полученные в режиме фрактальной генерации

С помощью алгоритма фрактальной генерации (п. 2.3.1) для ряда значений межнуклеосомного расстояния  $\ell$  и фрактальной размерности  $d_s$  была получена серия структур из  $2^{20}$  нуклеосом. Рассчитанные зависимости радиуса гирации  $\langle r_g(N_g) \rangle$  и спектры МУРН имели степенной характер, что позволило оценить фрактальные размерности  $d_g$  и  $d_I$  по формуле (2) и из выражения  $I \propto s^{-d_I}$ . Было установлено, что значение  $\ell = 300 \text{ \AA}$  обеспечивает хорошее согласие всех трёх оценок фрактальной размерности: КУН корреляций  $d_g/d_s$ ,  $d_I/d_s$  и  $d_I/d_g$  составили 0,987 ( $R^2 = 0,987$ ), 1,007 ( $R^2 = 0,984$ ) и 1,021 ( $R^2 = 0,997$ ) соответственно.

График зависимости  $\langle r_g(N_g) \rangle$  для типичной фрактальной структуры с размерностью  $d_s = 2,4$  приведён на рис. 3А. В начале наблюдается относительно короткий участок ( $N_g < 10$ ) с «КУН» свыше 0,5, обусловленный эффективным отталкиванием нуклеосом. За исключением этого участка зависимость  $\langle r_g(N_g) \rangle$  является линейной с КУН 0,42, который соответствует значению размерности  $d_g = 2,38$ , что весьма близко к ожидаемому значению  $d_s = 2,4$ .



**Рис. 3.** Свойства двух фрактальных моделей наднуклеосомных структур из  $2^{20}$  нуклеосом, фрактальные размерности:  $d_s = 2,4$  (А, Б) и  $d_s \in \{2; 3\}$  (В, Г). Пунктирные линии показывают ЛА. А, В. Зависимость  $\langle r_g(N_g) \rangle$ : символами  $\bullet$  обозначены измеренные значения; сплошными линиями показаны значения, соответствующие  $d_s$ ; штриховые линии, соответствующие  $d_g \in \{1; 2; 3\}$ , приведены для сравнения. А. ЛА  $y = \alpha + \beta x$ : КУН 0,42 ( $R^2 = 0,999$ ) соответствует значению  $d_g = 2,38$ . В. ТК по построению (отмечена стрелкой  $\uparrow$ ) — 256 нуклеосом (1697  $\text{\AA}$ ). ЛА  $y = \alpha + x/d_s$  ( $R^2 = 0,999$ ) указывают на другую ТК (отмечена стрелкой  $\downarrow$ ) — 584 нуклеосом (2933  $\text{\AA}$ ). Б, Г. Спектры МУРН: показаны сплошными линиями для указанных значений  $W_D$ . Б. ЛА  $y = \alpha + \beta x$ : КУН  $-2,45$  ( $R^2 = 0,999$ ) соответствует значению  $d_I = 2,45$ . Г. ЛА  $y = \alpha - 2x$  ( $R^2 = 0,998$ ) и  $y = \alpha - 3x$  ( $R^2 = 0,991$ )

Как и для структур, полученных в режиме одноцепочечной генерации, спектры МУРН для фрактальных моделей имеют две области: наднуклеосомную ( $s < 0,02 \text{ \AA}^{-1}$ ) и нуклеосомную (рис. 3Б). В наднуклеосомной области спектры являются независимыми от значения  $W_D$ ; в нуклеосомной области, напротив, наблюдаются особенности для спектров белковой части ( $W_D = 0,65$ ) и ДНК ( $W_D = 0,40$ ), обусловленные локально-регулярной упаковкой нуклеосом, которая возникла вследствие работы алгоритма генерации. Наднуклеосомная часть спектров является линейной при  $s < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$  с КУН  $-2,45$ , что соответствует размерности  $d_I = 2,45$ , при этом  $d_s = 2,4$  и  $d_g = 2,38$ .

Из экспериментальных спектров МУРН для целых ядер были получены оценки фрактальной размерности хроматина  $d_I$ , находящиеся в диапазоне от  $\sim 2$  до  $\sim 3$ . С помощью других экспериментальных методов были сделаны независимые оценки фрактальной размерности хроматина: от 2,2 (диффузионные исследования) до 3 (метод Hi-C). Это послужило отправной точкой для генерации наднуклеосомной структуры с двумя различными фрактальными размерностями  $d_s$ .

Наднуклеосомная структура из  $2^{20}$  нуклеосом с фрактальными размерностями  $d_{s1} = 3$  и  $d_{s2} = 2$  весьма похожа на структуру с фрактальной размерностью  $d_s = 2,4$ . Анализ зависимости  $\langle r_g(N_g) \rangle$  (рис. 3В) выявил двухуровневую организацию структуры с точкой кроссовера (ТК) 584 нуклеосом ( $2933 \text{ \AA}$ ), которая смещена от ТК по построению (256 нуклеосом,  $1697 \text{ \AA}$ ) на лишь немногим более одного порядка генерации.

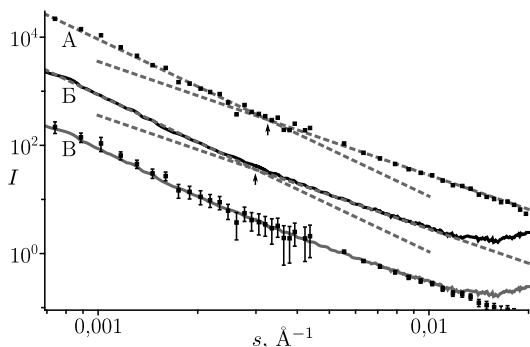
Спектр МУРН для структуры с кроссовером (рис. 3Г) схож со спектром для наднуклеосомной структуры с фрактальной размерностью  $d_s = 2,4$  и состоит из наднуклеосомной части ( $s < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$ ) с  $I \propto s^{-d_I}$  и нуклеосомной части с характерными особенностями, обусловленными локально-регулярной структурой. В наднуклеосомной области видны два участка, соответствующие фрактальным размерностям  $d_I \approx d_s$ .

Наднуклеосомная часть спектров МУРН, рассчитанных для фрактальных моделей наднуклеосомной структуры хроматина, особенно спектр для структуры с двумя различными значениями фрактальной размерности — 3 (для больших размеров) и 2 (для меньших размеров), находится в качественном согласии с теми спектрами МУРН, которые были получены в нашей лаборатории для целых ядер.

На рис. 4 приведён спектр МУРН, полученный для ядер лимфоцитов крысы при концентрации тяжёлой воды в растворе  $W_D = 0,4$ . Спектр имеет два линейных участка в двойном логарифмическом масштабе с КУН  $-2,9$  и  $-2,1$  и ТК  $1,9 \times 10^3 \text{ \AA}$  (рис. 4А). Предварительные расчёты показали, что спектры, рассчитанные для фрактальной наднуклеосомной модели из  $2^{20}$  нуклеосом для  $r_{\max} = 120 \text{ \AA}$ ,  $\ell = 300 \text{ \AA}$ ,  $n = 2$ ,  $k_c = 17$  с двумя фрактальными размерностями  $d_{s1} = 2,9$  и  $d_{s2} = 2,1$ , имеют в наднуклеосомной области ( $s < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$ ) два линейных участка с  $d_I \approx d_s$  и близкой ТК (рис. 4Б) и удовлетворительно описывают экспериментальные данные ( $R_I = 0,01$ , рис. 4В).

Данные диффузионных исследований хроматина (характерные размеры  $< 100 \text{ нм}$ ) говорят в пользу низких значений фрактальной размерности (2,2–2,6), в то время как данные метода Hi-C (разрешение





**Рис. 4.** Сравнение спектров МУРН. Интенсивность  $I(s)$  в о. е., на одном графике показаны: ЛА экспериментальных данных (А), ЛА расчётного спектра (Б), наложение спектров (В). Символами  $\blacksquare$  показаны экспериментальные данные, сплошными линиями — расчётный спектр, штриховыми линиями — ЛА, стрелками  $\uparrow$  отмечены ТК. **А.** ЛА  $y = \alpha + \beta x$ : КУН  $-2,90 \pm 0,04$  ( $R^2 = 0,990$ ) и  $-2,10 \pm 0,02$  ( $R^2 = 0,992$ ). ТК  $1,9 \times 10^3$  Å. **Б.** ЛА  $y = \alpha + d_{s1}x$  ( $R^2 = 0,999$ ) и  $y = \alpha + d_{s2}x$  ( $R^2 = 0,997$ ). ТК  $2,1 \times 10^3$  Å. **В.** Нормировка выбрана так, чтобы минимизировать значение  $R_f$

~  $5 \times 10^3$  нуклеосом) описываются моделью фрактальной глобулы (размерность 3). Таким образом, единая фрактальная модель наднуклеосомной структуры хроматина с кроссовером способна описать данные, полученные с помощью трёх независимых экспериментальных методов.

### Основные результаты и выводы

1. Разработан новый метод расчёта спектров МУРН, основанный на МК-моделировании распределения парных расстояний.
2. Установлено, что разработанный метод расчёта спектров МУРН применим для систем, состоящих из  $\sim 10^{10}$  атомов.
3. Разработан алгоритм генерации фрактальных структур на основе преобразования самоподобия.
4. Показано, что разработанный алгоритм фрактальной генерации наднуклеосомных структур позволяет создавать фрактальные структуры с заданным значением фрактальной размерности в интервале  $2 \leq d_s < 3$  или с двумя различными значениями фрактальной размерности (структуры с кроссовером).
5. Создан ряд моделей наднуклеосомной структуры хроматина геномного размера, полученных в режимах одноцепочечной и фрактальной генерации.
6. Показано, что спектры МУРН, рассчитанные для фрактальных моделей наднуклеосомной структуры хроматина с кроссовером, удовлетворительно описывают особенности экспериментально наблюдаемых спектров МУРН для целых ядер.

### **Список опубликованных работ по теме диссертации**

1. *Patovskiy A. et al.* SANS Spectra of the Fractal Supernucleosomal Chromatin Structure Models // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2012. V. 351. P. 012007.
2. *Patovskiy A. et al.* Modeling and SANS Spectra of Chromatin Supernucleosomal Structures at Genome Scale // *J. Appl. Phys.* 2011. V. 110. P. 102217.
3. *Руденко Е. и др.* Анализ молекулярных механизмов растяжения коротких фрагментов двухнитевых ДНК // *НТБ СПбГПУ.* 2011. V. 134. P. 147–154.
4. *Patovskiy A., Petukhov M.* Genome-Wide Search for Local DNA Segments with Anomalous GC-Content // *J. Comput. Biol.* 2009. V. 16. P. 555–564.
5. *Илатовский А. и др.* Спектры МРН для локально-регулярных моделей супернуклеосомных структур хроматина хромосомного размера // *Материалы VIII Национальной конференции РСНЭ-НБИК.* М., 2011. С. 445.
6. *Лебедев Д. и др.* Использование методов нейтронного рассеяния в изучении структуры и динамики нуклеопротеидных комплексов // *Материалы VIII Национальной конференции РСНЭ-НБИК.* М., 2011. С. 31.
7. *Илатовский А. и др.* Расчёт спектров МРН для моделей супернуклеосомной структуры хроматина // *Материалы 15-й Международной Пущинской школы-конференции молодых учёных.* Пущино, 2011. С. 118.
8. *Patovskiy A. et al.* SANS Spectra and Modeling of Chromatin Supernucleosomal Structures at Genome Scale // *Proceedings of the 11th Intl. Conference on Surface X-ray and Neutron Scattering.* USA, Evanston, 2010. PO-A-45.
9. *Patovskiy A. et al.* Molecular Dynamics and Large-Scale Conformational Flexibility of DNA-Binding Proteins // *Proceedings of the 11th Intl. Conference on Surface X-ray and Neutron Scattering.* USA, Evanston, 2010. PO-A-46.
10. *Илатовский А.* Моделирование супернуклеосомной структуры хроматина // *Материалы 13-й Санкт-Петербургской ассамблеи молодых учёных и специалистов.* СПб., 2008. С. 37.
11. *Илатовский А., Петухов М.* Расчёт спектров МРН для супернуклеосомной структуры хроматина // *Материалы конференций политехнического симпозиума.* СПб., 2008. С. 115–116.
12. *Patovskiy A. et al.* Modelling of the Supernucleosomal Chromatin Structure // *Proceedings of XX Workshop on Neutron Scattering Application for Condensed Matter Investigations.* Russia, Gatchina, 2008. P. 165.
13. *Илатовский А., Петухов М.* Моделирование супернуклеосомной структуры хроматина // *Материалы конференций политехнического симпозиума.* СПб., 2007. С. 119–120.

Работа выполнена при финансовой поддержке РАН (проект 4.7), Правительства Санкт-Петербурга (ПГ № 2.6/25-04/05), Министерства образования и науки РФ (РНП 2.2.1.1.4663, ГК № 02.740.11.5223, № 11.519.11.2002) с использованием научного оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ».